

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E. A. P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Actividad de la isoenzima ADA2 en líquido
cefalorraquídeo como ayuda diagnóstica en
tuberculosis meníngea
HNGAI Setiembre 1999- Enero 2000**

TESIS

para optar el título profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el
área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Helí Jaime Barrón Pastor

Ruth Isela Cisneros Chinchay

ASESOR

Alvaro Julián Marcelo Rodríguez

Miguel Sandoval Vegas

Lima-Perú

2000

A mis padres, Fernando y Mercedes.

A mi hermano, Carlos David.

A mi hijo, Daniel.

A Dios.

ASESORES:

Ph. D. Alvaro Julián Marcelo Rodríguez

Lic. T.M. Miguel Sandoval Vegas.

DEDICATORIA

A mis padres Rolando y Herlinda.

A mis hermanos Danilo, David,

Américo, Arquímedes, Stalin.

A Elena

A mis padres Simeón y Gloria,

A mis hermanos Pedro,

Alex, Edwin, Narda, Liz y a

Mis sobrinos Willie, Jesús y

Ronald.

Agradecimientos

A todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización del presente estudio, en especial:

A la Dra.: Raquel Oré Sifuentes, Directora del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición Alberto Guzmán Barrón, por habernos permitido realizar la presente investigación.

A nuestro asesor Ph.D. Alvaro Marcelo Rodríguez, por su invalorable ayuda, asesoría permanente, por los reactivos y materiales sin lo cual no hubiera sido posible llevar a cabo la presente investigación.

A nuestro asesor Lic. T.M. Miguel Sandoval Vegas, por su constante ayuda académica.

A la Dra.: Gladys Casimiro Bravo Jefe del Laboratorio de Bioquímica del HNGAI, por las facilidades brindadas para la recolección de muestras y el tratamiento de datos del LCR.

Al Dr. Manuel Fernández Vega Jefe del Laboratorio de Hematología del HNGAI, por la revisión de los manuscritos de la presente tesis y la asesoría en el análisis estadístico de los datos.

A la Dra. Hinostroza del Servicio de Bioquímica del HNGAI por su apoyo en la revisión de historias clínicas.

Al Dr. Celso Inga Jefe del Servicio de Inmunodiagnóstico del HNGAI, por sus valiosas sugerencias.

A los Tecnólogos Médicos del HNGAI: Lic. Juana Ordoñez, Lic. Giuliana Córdova, Lic. Katia Linares, Lic. Hilda Palomino.

A la Tecnólogo Médico Lic. Katiushka Suarez del Hospital Alberto Sabogal Sologuren, por su invalorable ayuda.

Al señor Wilder Bendeزú, del HNGAI por su valioso apoyo técnico.

CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN	7
II. INTRODUCCIÓN	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
IV. RESULTADOS	36
V. DISCUSIÓN	52
VI. CONCLUSIONES	59
VII. RECOMENDACIONES	61
VIII. BIBLIOGRAFÍA	63
IX. ANEXOS	70
- TÉCNICA DEL TEST DE ADA TOTAL	
- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.	
- ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LAS ISOENZIMAS DE ADENOSINA DEAMINASA	

GLOSARIO

ADA.	Adenosina Deaminasa
ADA1	Isoenzima Adenosina Deaminasa 1
ADA1cp	Forma molecular de ADA de 280Kda, conformada por dos isoenzimas ADA1m unidas por una proteina combinante cp
ADA1m	Forma molecular ADA1 monomérica de 27 Kda.
ADA2	Isoenzima Adenosina Deaminasa 2
AMP	Adenosina monofosfato
BAAR	Bacilo Alcohol Acido Resistente.
BK	Bacilo de Koch
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
HNGAI	Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MEC	Meningoencefalitis
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SNC	Sistema Nervioso Central
TBC	Tuberculosis
U/L	Unidades por litro.

RESUMEN

RESUMEN

I. RESUMEN

Se realizó un estudio de isoenzimas de Adenosina Deaminasa (Adenosina Aminohidrolasa, EC 3.5.4.4), en líquido cefalorraquídeo de pacientes con Tuberculosis Meníngea y otras enfermedades del sistema nervioso central con actividad ADA incrementado; utilizando la técnica estandarizada de electroforesis en gel de poliacrilamida (método electroforético de Laemmli modificado), una técnica de revelado enzimático y la densitometría para distinguir las isoenzimas en cada grupo.

Se evaluaron 19 muestras de LCR de pacientes con cuadro clínico de TBC meníngea. al momento de obtener las muestras, los pacientes no tenían diagnóstico confirmatorio; posteriormente se realizó la correlación clínica respectiva. Para corroborar la baja frecuencia de esta enfermedad se realizó la revisión de las historias clínicas desde un año antes (setiembre 1998 - agosto 1999).

Para el ensayo se consideró las muestras que tenían actividad ADA mayor de 9 U/L, determinado por el método espectrofotométrico de Giusti y Galanti, las cuales fueron conservadas a - 40°C hasta la corrida electroforética.

Para cada carril se aplicó 120 μ l de muestra, y la corrida fue realizada en un sistema de electroforesis vertical usando buffer fosfato 0.1 M a pH 6.7.

Se encontró que las medianas de las actividades de adenosina deaminasa totales en LCR de pacientes con TBC meníngea son mayores que el LCR de otras enfermedades parainfectivas del SNC. De otro lado ADA1m tuvo muy poca contribución a la actividad ADA total tanto en TBC meníngea como en otras patologías; ADA1cp tuvo mayor contribución de la actividad ADA total para ambos grupos, mostrándose mayor en las enfermedades no TBC meníngea y la contribución ADA2 mostró un incremento en tuberculosis meníngea respecto de otras enfermedades del SNC.

INTRODUCCIÓN

Se concluye que la electroforesis de LCR es una herramienta que permite distinguir las isoenzimas ADA; evidenciando la presencia de niveles elevados de isoenzima ADA2 en TBC meníngea, como consecuencia del incremento de la línea celular monocito-macrófago en LCR.

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad del hombre y de muchas especies de animales, producida por bacilos del género *Mycobacterium*. La enfermedad adopta formas muy diferentes según la intensidad de la infección y del órgano atacado. Puede ser aguda o crónica, localizada o generalizada. La lesión inicial generalmente se localiza en los pulmones con una combinación de reacciones exudativo productiva, con la formación de tubérculo y fibrosis; y de aquí el bacilo se disemina por todo el organismo por varias vías:

- Vía Linfática: Se da en el curso de las manifestaciones clínicas de un organismo que por primera vez entra en contacto con el bacilo.
- Vía Hematógena: Se hace a partir de un ganglio linfático o la apertura de una lesión en una vena.
- Vía Bronquial: Son transportados a todas partes del sistema respiratorio.

La meningitis tuberculosa se caracteriza por la producción de un exudado

gelatinoso que se deposita en la base del cerebro interfiriendo con la circulación del líquido cefalorraquídeo.

Típicamente la meningitis tuberculosa se presenta en adultos con un curso indoloro, con manifestaciones clínicas variables. Cefalea y fiebre por encima de 14 días, es un criterio importante a tomar en cuenta para el diagnóstico, mientras que el déficit focal neuronal es opcional.

Al diagnóstico clínico:

- Síntomas sistémicos inespecíficos.
- Manifestaciones de hipertensión endocraneana.
- Signos neurológicos variables.
- Compromiso sensorio en etapas tardías.
- Meningitis de líquido cefalorraquídeo claro.
- ADA elevada en líquido cefalorraquídeo.
- Estudio inmunológico de líquido cefalorraquídeo.

La meningitis tuberculosa cursa en tres etapas:

- ETAPA I: Manifestaciones sistémicas, el paciente está consciente, lúcido, presenta síntomas meníngeos pero no neurológicos.
- ETAPA II: Paciente confuso, presenta signos neurológicos y de hipertensión

endocraneana.

- ETAPA III: El paciente tiene grave compromiso de conciencia, mentalmente inaccesible por la profundidad del estupor, delirio, coma o bien hemiplejía o paraplejía completa ¹⁴.

La Meningoencefalitis tuberculosa requiere detección pronta e instalación de la terapia apropiada. El diagnóstico y tratamiento temprano pueden llevar a un 100% de recuperación sin secuela alguna.

La enfermedad no tratada es mortal en 3 a 8 semanas desde su presentación y conlleva un alto riesgo de severos daños neurológicos si la terapia tarda.

Invariablemente existe un foco de infección en alguna parte (usualmente pulmonar) y la bacteria alcanza el Sistema Nervioso Central por diseminación hematógena o en algunos casos por extensión local. Estudios retrospectivos confirman que al menos 75% de los pacientes presentó la infección dentro de los 12 meses antes de su admisión por meningitis ¹⁵.

El LCR contiene de forma típica un incremento de la concentración de proteínas, un aumento en el número de linfocitos y un contenido bajo en glucosa en relación con el que correspondería de acuerdo con la concentración de glucosa en sangre (hipoglucorraquia). Sin embargo, a menudo uno o más de estos hallazgos no están presentes. Al principio de la enfermedad existe con frecuencia pleocitosis polinuclear.

Las proteínas en la Tuberculosis meníngea se encuentra usualmente de 100 a 500 mg/dL (1.0 a 5.0 g/L); pero en la enfermedad avanzada puede llegar de 1 000 a 1 500 mg/dL (10.0 a 15.0 g/L) y causar un bloqueo espinal con muy mal pronóstico ²⁰. En la mayoría de los casos existe hipogluorraquia con una media de 30 mg/dL.

El siguiente cuadro muestra las características de las distintas meningitis.

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN MENINGITIS

	CELULAS	PROTEINAS g/L	GLUCOSA mmol/L
NORMAL	<5 linf/mm ³	0.2-0.45	2.75-4.4
MEC TBC	<1000 linf/mm ³	>1.00	< 2.5
MEC VIRAL	<100 linf/mm ³	<1.00	>2.5
MEC BACTERIANA	>1000 PMN	>1.00	>2.5

El hecho de no encontrar patógenos bacterianos comunes, aumenta la probabilidad de que se trate de una meningitis tuberculosa, si bien ello no excluye la posibilidad de una meningitis vírica, bacteriana parcialmente tratada o fúngica.

La poca sensibilidad de la baciloscopía en líquido cefalorraquídeo (22%) y el prolongado período de cultivo (entre 2 y 8 semanas), no son útiles en la conducta

terapéutica inicial, estas pruebas han hecho que el test de Adenosina Deaminasa (ADA) sea una prueba frecuentemente utilizada en nuestro medio para confirmar la sospecha clínica de infección por *Mycobacterium tuberculosis*, dado que la mortalidad continúa siendo elevada (25-30%) y debido a que los trastornos neurológicos persistentes son incluso más frecuentes, el tratamiento antituberculoso debe iniciarse inmediatamente cuando se sospeche una meningitis tuberculosa y no se observan micobacterias en la extensión ¹⁶.

La meningitis tuberculosa representa la cuarta complicación neurológica más importante y la segunda enfermedad oportunista más frecuente después de toxoplasmosis cerebral en Europa, esto se explica en gran parte por la alta prevalencia de pacientes infectados por VIH como en España, donde la tuberculosis es endémica ³¹.

En Hong Kong, la meningitis tuberculosa sigue siendo común. La incidencia anual es de $1,8 \times 100\,000$ habitantes ²². Se observa un incremento global de la tuberculosis desde 1980, esto es atribuible particularmente a la epidemia del SIDA, pues la mayoría de pacientes con meningitis tuberculosa fueron infectados por VIH.

Aunque es una enfermedad previsible y curable, la tuberculosis sigue siendo una amenaza para la salud pública en América. Muchos factores han creado las condiciones propicias para un agravamiento de los problemas. Además de la pandemia del SIDA, factores socioeconómicos como la situación de pobreza, crecimiento de la población marginal son entre otros los factores que han hecho

posible el incremento de los casos de tuberculosis en nuestra región.

La meningitis tuberculosa es la forma más grave de la enfermedad con una alta letalidad. Se observa sobre todo en niños pequeños en países con baja cobertura de vacunación. Actualmente también se presenta en adultos debilitados ¹⁴.

La meningitis tuberculosa es una forma grave de tuberculosis, cuya incidencia representa el 5-10% de las formas extrapulmonares. Sigue siendo frecuente en países en vías de desarrollo, pero es rara en países tecnológicamente avanzados. Los pacientes con infección por el HIV corren mayor riesgo de sufrir esta enfermedad ¹⁵.

En el Perú, en 1 985 aproximadamente, el 5% de los 4 000 casos reportados de Tuberculosis extrapulmonar fueron meningitis tuberculosa. Además con la tendencia en aumento de la tuberculosis diseminada asociada al SIDA, existe un amplio potencial para el compromiso del Sistema Nerviosos Central.

En el Perú la Tuberculosis meníngea fue en aumento de 1 985 a 1 992. Según el Programa de Control de la Tuberculosis del Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS) actual **EsSalud**, en 1 991 se detectaron 3 casos de meningitis tuberculosa a menores de 5 años y para 1 992 el número de casos se incrementó a 26 indicando un repunte de la enfermedad ⁴.

En 1 995 las OMS y la OPS notificaron 244 381 casos de tuberculosis (tasa de 31,5 x 100 000 habitantes) en América; éstos casos representan el 7,5% del total mundial con más de 3,2 millones de casos notificados a la OMS. El análisis

individual de cada país muestra una gran variabilidad en la tendencia; así, Chile, Cuba y Uruguay muestran una franca tendencia descendente.

En el Perú en 1 994 se notificaron 33 925 casos (tasa 145,4); en 1 995 se notificó 32 096 casos (tasa 139,6); en 1 996 se dio 26 800 casos (tasa 11,9) que fueron los casos BK positivo, caso pulmonar con baciloscopia positiva ²⁶.

En el Perú la tuberculosis fue en aumento de 1 985 a 1992, desde allí la tendencia es descendente mantenida hasta 1 996. La tasa de incidencia de Meningitis Tuberculosa infantil disminuyó de 2,01 por 100 000 habitantes a 1,57 en 1 995 ²⁷.

Desde la década pasada, han sido reportados varias pruebas bioquímicas como ayuda al diagnóstico de meningitis tuberculosa, éstas incluyen la determinación de la concentración de lactato, actividad lactato deshidrogenasa y otras.

Ultimamente han sido reportados ensayos de ADA para distinguir la meningitis tuberculosa de otras meningitis, donde lo niveles de la enzima están considerablemente elevados tanto en meningitis tuberculosa y meningitis bacteriana ⁹.

Se ha detectado niveles elevados de ADA en otras enfermedades del Sistema Nervioso Central, estos incluyen criptococosis meníngea, toxoplasmosis cerebral, meningitis bacteriana e incluso enfermedades no infecciosas como hemorragia subaracnoidea ^{12, 13, 32}; y en otro tipo de enfermedades tales como enfermedades del hígado, tifoidea, mononucleosis infecciosa y ciertas neoplasias especialmente

de origen hematopoyético ^{7,35}.

Para el diagnóstico de meningitis tuberculosa el test de ADA ha demostrado una sensibilidad de 66% ⁵ hasta 100% ³³ y una especificidad entre 87-99% ^{5, 23,29, 33, 37}

La adenosina deaminasa, una importante enzima que participa en la vía degradativa de la Adenosina Monofosfato (Acido Adenílico, AMP) un nucleótido puro, juega un rol central en el desarrollo del sistema inmune.

Esta enzima cataliza la desaminación de Adenosina y deoxiadenosina en inosina y deoxinosina respectivamente ^{1, 10,21} ADA es expresado prácticamente en todas las células y tejidos de los mamíferos; pero los niveles pueden variar de acuerdo al tejido y las especies. Primariamente esta enzima se localiza en la porción citoplasmática de muchos tipos celulares. En humanos los niveles de esta enzima en el timo se encuentran 100 veces más concentrada que en otros tejidos. En el suero la enzima es derivado principalmente de los linfocitos. Esta enzima está relacionada en la función y replicación de los linfocitos T. También juega un rol importante en la maduración y activación de los linfocitos ¹¹.

Una unidad de adenosina deaminasa se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1µmol de amonio por minuto a partir de adenosina en condiciones de ensayo estándar⁷. En 1973 Piras y Gralasis señalaron que en la meningitis tuberculosa había elevación de la actividad de ADA con respecto a las meningitis víricas. Esta prueba resulta de gran sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de meningitis tuberculosa proponiéndose valores mayores a 9 U/L para el diagnóstico ³⁰.

Los resultados se expresan en U/L. Para el líquido cefalorraquídeo el valor máximo normal es de 6 U/L ^{3,5,32,33}.

Sin embargo, C. Gakis distingue 2 isoenzimas de ADA las cuales actúan sobre 2 substratos diferentes: Adenosina (ADA1) y 2-deoxiadenosina (ADA2).

La ADA1 de los fluidos biológicos proviene de la necrosis celular y es la que predomina en las meningitis bacterianas; mientras que la ADA2 se encuentra sólo en los monocitos y macrófagos y es liberada cuando son invadidas por microorganismos intracelulares, como el *Mycobacterium tuberculosis*. La enzima ADA es producida en el LCR por células presentes en la misma, ya que esta enzima no puede atravesar la barrera hematoencefálica ¹⁷. La ADA2 proviene de células presentes en el LCR, como en la meningitis tuberculosa, donde proviene de los macrófagos, no pudiendo atribuirse su presencia al tejido cerebral, porque sus células no poseen la ADA₂.

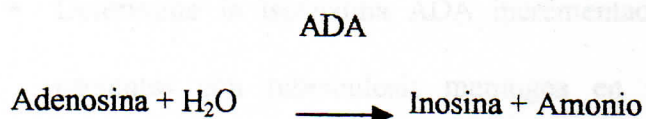
Existen 3 formas moleculares de la enzima: **ADA1** es una proteína monomérica con una masa molecular aproximada de 35 KDa; **ADA1cp** con una masa molecular de 280 KDa compuesto por 2 moléculas ADA1 unidas por una proteína combinante; y una tercera isoenzima **ADA2** ^{23,34,36}.

La isoenzima ADA1 y ADA1cp, y la isoenzima ADA2 tienen propiedades bioquímicas únicas. Así la isoenzima ADA1 está presente en todas las células con alta actividad en linfocitos y monocitos, considerando que la isoenzima ADA2 aparecen solamente en monocitos ^{7, 17, 34}.

Debido a la única distribución y caracterización de las isoenzimas de ADA; es necesario determinar la contribución de cada una a la actividad total, los métodos usados para distinguir las 2 isoenzimas son generalmente basados en la tasa de actividad usando 2 substratos: adenosina e inosina respectivamente.

MÉTODOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ADA :

a.- Método Espectrofotométrico de Giusti y Galanti: Se puede usar para determinar actividad ADA total, el principio es el siguiente:



El amonio formado durante 30 minutos de incubación a 37° C en presencia de Adenosina en Buffer Fosfato a pH 7,4 es estimado colorimétricamente a 660 nm¹¹.

Para distinguir entre la 2 formas ADA (ADA1 y ADA2) se mide la actividad usando la misma técnica pero añadiendo al sistema de reacción erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA) que es un potente inhibidor de la isoenzima ADA1. En presencia de EHNA sólo la isoenzima ADA2 es activa. La actividad ADA1 puede ser calculado sustrayendo actividad ADA2 de la actividad total. Sin embargo este método no puede distinguir entre ADA1 y ADA1cp³⁵.

También existe una técnica diseñada por Buel y MacQuarrie para distinguir las 3 isoenzimas de ADA usando electroforesis en Acrilamida. (PAGE)⁶

Debido al incremento de casos en tuberculosis meníngea en nuestro medio, por los

problemas en el diagnóstico oportuno (demora en el cultivo, baja sensibilidad de la coloración para bacilos alcohol ácido resistentes BAAR), así mismo la inespecificidad en la cuantificación de la actividad ADA total, como hemos mencionado puede estar incrementado en otras patologías, planteamos el presente estudio cuyo objetivo es:

- Realizar un estudio de isoenzimas ADA en Líquido cefalorraquídeo de pacientes con tuberculosis meníngea en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen en el período Setiembre de 1 999 - Enero de 2 000.
- Determinar la isoenzima ADA incrementada en Líquido cefalorraquídeo de pacientes con tuberculosis meníngea en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen en el período Setiembre de 1 999 - Enero de 2 000.
- Cuantificar las actividades de las isoenzimas ADA en Líquido cefalorraquídeo de pacientes con tuberculosis meníngea en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen en el período Setiembre de 1 999 - Enero de 2 000.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.MATERIALES

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Muestras de líquido cefalorraquídeo.

Las muestras de LCR para el presente trabajo fueron obtenidas del laboratorio de Bioquímica del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI), esta muestra fue tomada por el personal médico, quien la envió al laboratorio de Bioquímica para hacer los análisis respectivos entre ellos el test de ADA cuando hay sospecha de Tuberculosis Meníngea (MEC TBC).

Estas muestras fueron recolectadas desde Setiembre de 1999 hasta Enero de 2 000.

Criterios de Inclusión.

Fueron incluidos los líquidos cefalorraquídeos de pacientes con:

- Diagnóstico Confirmatorio de Tuberculosis Meníngea al ser dado de alta el paciente.

- LCR con Niveles de ADA superior a 9 U/L. ⁴

Criterios de Exclusión.

Fueron excluidos los líquidos cefalorraquídeos de pacientes con:

- LCR hemorrágico.

- Preparación de los estándares se usó:

Pool de glóbulos rojo grupo "O", para isoenzima ADA1m.

Pool de sueros normal, para proteína combinante.

Suero de pacientes con hepatitis crónica, para ADA2.

3.1.2. REVISIÓN DE HISTORIAS CLÍNICAS.

- Para obtener el diagnóstico final de TBC meníngea, se revisó las Historias Clínicas de los pacientes que presentaron en LCR un valor de ADA total mayor a 9 U/L en el período Setiembre de 1 999 - Enero de 2 000.
- Para corroborar la baja frecuencia de la enfermedad se revisó las Historias Clínicas de los pacientes que presentaron en LCR un valor de ADA total mayor a 9 U/L, un año antes del estudio, en el período Setiembre de 1 998 - Agosto de 1 999.
- Además se tomaron en cuenta parámetros bioquímicos (Glucosa, Proteínas) y de celularidad, tal como se muestra en los resultados.

3.1.3. REACTIVOS.

Los reactivos fueron de grado analítico.

3.1.3.1. Reactivos para la corrida electroforética.

- Acrilamida(SIGMA)
- Bisacrilamida(SIGMA)
- Persulfato de Amonio (Grado analítico)
- TEMED (BIO-RAD)
- Agua bidestilada. (Grado analítico)
- Cloruro de Sodio al 0.9%
- Na_2HPO_4 (PAXNM)
- KH_2PO_4 (PAXNM)
- 2-mercaptoetanol.(SERVA)
- Glicerol.(BIO-RAD)

3.1.3.2. Reactivos para la coloración enzimática.

Fueron de grado analítico, adquiridos de la casa SIGMA.

- Adenosina (9- β -D Ribofuranos y / adenina).
- Nucleósido Fosforilasa (E. C. 2.4.2.1, 27 unidades/ mg prot.).
- Xantina Oxidasa (oxygen oxidoreductase EC 1.1.3.22, 0,66 unidades/ mg prot.).
- MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide).
- Metosulfato de Fenazina.
- Fosfato de Sodio.

3.1.3.3. Buffer para la Coloración Enzimática.

- Trizma Base (SIGMA)

- L-Histidina (SIGMA)
- HCl (grado analítico)

3.1.4. EQUIPOS Y MATERIALES.

3.1.4.1. EQUIPOS.

- Fuentes de Poder
- Cámaras para electroforesis vertical
- Micropipetas unicanal de rango variable, marca Labopette de 50 - 200 μ L y Hirschmann Laborgerate de 1 - 20 μ L.
- Propipetas.
- Cámara fría a 4° C LKB Bromma 2023 Minicold Lab, de 10 a - 40°C.
- Centrífuga refrigerada, marca IEC Centra MP4R (International Equipent Company).
- Incubadora a 37° C, MLW WS-50.
- Refrigeradora Shaige..
- Bomba de vacío.
- Congeladora a - 40° C, Frigigayre General Motors- Sanyo Ultra Low.

3.1.4.2.MATERIALES.

- Membranas de acetato de celulosa
- Tubos Eppendorf
- Puntas para micropipetas

- Frascos de vidrio.
- Kitasato
- Pipetas de vidrio
- Probetas.
- Beaker.
- Embudo.
- Tubos cónicos
- Pipetas Pasteur

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE ISOENZIMAS DE ADENOSINA DEAMINASA.

PREPARACIÓN DEL BUFFER DE DIÁLISIS: BUFFER FOSFATO 0.001M

25 mL de Buffer Fosfato 0.1 M

475 mL de Agua Bidestilada.

35 μ L de Mercaptoethanol 14.26 M

ESTÁNDAR DE ADA1m

Se preparó siguiendo la técnica descrita por Buel y MacQuarrie ⁶

Se preparó un pool de glóbulos rojos frescos de grupo sanguíneo "O" de pacientes seronegativos procedentes del Banco de Sangre del HNGAI.

Todos los procedimientos para la preparación del Estándar de isoenzima ADA1m fueron realizados a 4°C.

Se tomó un total de 50 ml de paquete globular, el cual fue centrifugado en tubos cónicos a 8000 RPM durante 10 minutos, luego del cual se eliminó el sobrenadante y el "buffy coat" usando una pipeta Pasteur.

Las células fueron lavadas con igual volumen de cloruro de sodio al 0.9 % a 8000 RPM durante 10 minutos; este procedimiento fue repetido durante tres veces.

Para la lisis de glóbulos rojos se mezcló un volumen de Glóbulos rojos lavados con tres volúmenes de agua bidestilada; el cual fue agitado suavemente durante 20 minutos.

Posteriormente los glóbulos rojos lisados fueron dializados durante 48 horas contras 5mM de buffer fosfato a pH 6.5 con 1 mM mercaptoethanol; el buffer de diálisis fue cambiado cada 12 horas.

Las muestras dializadas fueron centrifugadas a 18000 RPM por 30 minutos; luego del cual se separó el sobrenadante a un tubo limpio. El precipitado se resuspendió en buffer de diálisis para centrifugar nuevamente, este procedimiento fue repetido hasta ajustar a un volumen final de 140 ml del sobrenadante en el cual está presente la isoenzima ADA1m.

ESTÁNDAR DE ADA1cp³⁴.

Para la preparación del estándar de ADA1cp se siguió el procedimiento descrito por Ungerer et al..

Se mezclaron volúmenes iguales del Estándar de ADA1m y Suero Normal y fueron incubadas a 37°C durante 1/2 hora. La presencia de grandes cantidades de la proteína combinante en el suero normal permite la formación de ADA1cp.³⁴

ESTANDAR DE ADA2

Según refiere Fumie Kobayashi.²¹ el suero de pacientes con hepatitis crónica activa presenta altos niveles de ADA 2 el cual fue usado como Estándar de ADA2. La banda mas catódica (al inicio de la corrida) representa dicha isoenzima

34

3.2.2. SEPARACIÓN DE ISOENZIMAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).

Para la preparación del gel se utilizó la técnica modificada de Laemmli al 5% de acrilamida, usando Buffer Fosfato 0.05M, a pH 6.7 en la cual no se usó SDS como en la técnica original, debido a que se debe trabajar con geles no denaturationes, pues el SDS puede causar denaturación a nivel de las isoenzimas de ADA.

Los geles tuvieron una dimensión de 80x90x1.5 mm. y fueron preparados en una cámara vertical de electroforesis.

Hay ciertas ocasiones cuando un paso de Pre-electroforesis puede ser beneficioso. Los geles siempre contienen un pequeño residuo de fracciones no polimerizados del monómero de acrilamida y esto puede reaccionar con los componentes de la muestra. Igualmente el Persulfato de Amonio es un agente oxidante y la fotopolimerización produce trazas de Peróxido de Hidrógeno, tales que ambas pueden causar oxidación y disminuir la actividad enzimática u otra actividad biológica. Tales problemas pueden ser grandemente solucionados con una Pre-electroforesis removiendo algunas cargas iónicas. O alternativamente los geles pueden ser sumergidos por un período de varios días en cambios severos de buffer.²

Por tal motivo en el presente trabajo se realizó previamente una preelectroforesis por 20 minutos a 20 mA y a 4°C; luego del cual se aplicaron 120 µL de c/u de las muestras y 30 µL de los estándares a los respectivos carriles.

Finalmente, la corrida electroforética fue realizada a 30 mA durante 5 horas a 4°C en buffer fosfato 0.1 M a pH 6.7.

3.2.3. COLORACIÓN ENZIMÁTICA.

El método de coloración de la actividad de adenosina deaminasa sobre el gel de poliacrilamida, fue reportada por Spencer et al. y modificada por J.P.J. Ungerer.

Las isoenzimas de la Adenosina Deaminasa en líquido cefalorraquídeo pueden ser demostradas, sometiendo la muestra de LCR a electroforesis, usualmente a pH 6.7 usando un gel de poliacrilamida como sostén. Las isoenzimas tienen diferentes

cargas a éste pH y emigran a 3 regiones distintas del electroforograma. Luego se localizan por medio de su capacidad para catalizar la reducción de un colorante a su forma colorida.

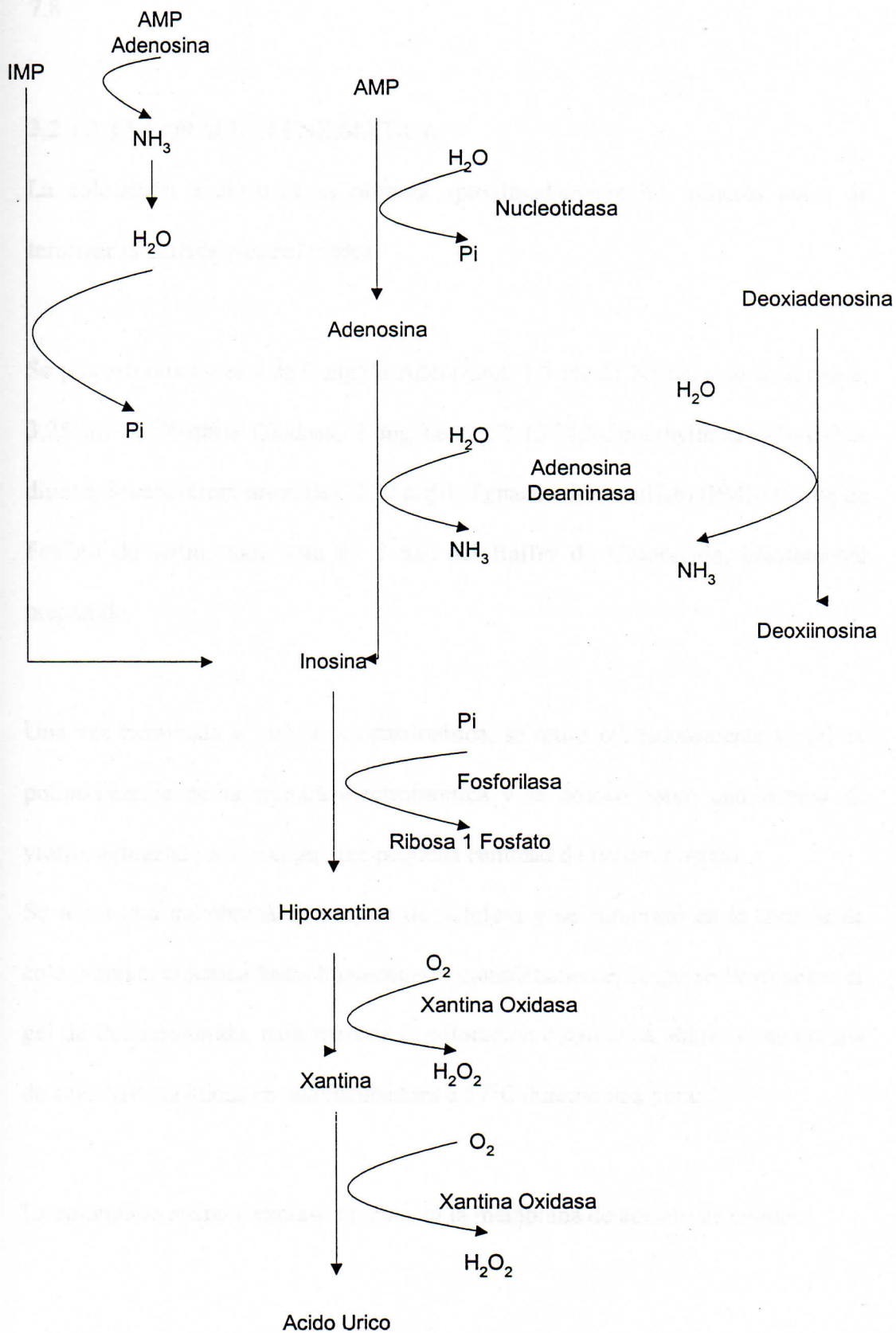
Un reactivo típico para el análisis de las isoenzimas de la Adenosina Deaminasa contiene lo siguiente:

1. Substrato reducido (Adenosina)
2. Nucleósido fosforilasa (Actúa sobre la Inosina),
3. Xantina Oxidasa, (actúa sobre Hipoxantina y Xantina)
4. Colorante oxidado sal MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide),
5. Phenazine methosulfate Un transportador intermediario de electrones para llevarlos entre la xantina y el colorante
6. Amortiguador; iones activados si es necesario (Fosfato de Sodio)

La Adenosina Deaminasa cataliza la formación de inosina (a partir de adenosina), (ver esquema de la siguiente página), la cual a través de la nucleósido fosforilasa se convierte en hipoxantina; luego la hipoxantina pasa a xantina y de aquí a ácido úrico por acción de la xantina oxidasa con la consiguiente liberación de electrones, los cuales son transferidos por la Fenazine metosulfato para reducir el colorante. Cuando la mezcla de reactivos se rocía sobre el electroforograma y se incuba a 37° C, tienen lugar las reacciones coordinadas de transferencia de electrones sólo en aquellas regiones donde se encuentra la Adenosina Deaminasa. Las intensidades relativas de las bandas pueden ser cuantificadas por un fotómetro adecuado.

Actividad de Adenosina Deaminasa

Reacciones Bioquímicas



3.2.3.1. PREPARACIÓN DEL BUFFER DE COLORACIÓN ENZIMÁTICA:

Se preparó usando 0.3 mol/L de Tris-HCl y 0.2 mol/L de L-Histidina a un pH de 7.8.

3.2.3.2. COLORACIÓN ENZIMÁTICA.

La coloración enzimática se prepara aproximadamente 10 minutos antes de terminar la corrida electroforética.

Se preparó una mezcla de 6 mg de Adenosina, 1.5 uL de Nucleosido fosforilasa, 3,25 uL de Xantina Oxidasa, 3 mg de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide), 0.20 mg de Fenazine Metosulfato (PMS) y 4mg de Fosfato de sodio; todo esto en 3 mL del Buffer de Coloración, previamente preparado.

Una vez terminada la corrida electroforética, se retiró cuidadosamente el gel de poliacrilamida de la cámara electroforética y se colocó sobre una lámina de vidrio, agregando sobre el gel una pequeña cantidad de Buffer Fosfato.

Se tomó una membrana de acetato de celulosa y se sumergió en la mezcla de coloración enzimática hasta humedecerlo completamente, luego se llevó sobre el gel de Poliacrilamida, para realizar la coloración enzimática sobre la membrana de acetato de celulosa en una incubadora a 37°C durante una hora.

La coloración aparece exclusivamente en la membrana de acetato de celulosa.

3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD RELATIVA PARA CADA ISOENZIMA.

La actividad relativa para cada isoenzima fue determinado por scanning densitométrico (EZC SCAN ver. 2.2 Helena Laboratories).

3.2.5. CONTROL DE CALIDAD

- a) Electroforesis Vertical. A diferencia de la metodología empleada por Ungerer y cols., se usó un sistema de electroforesis vertical; se hicieron ensayos preliminares a diferente intensidad de corriente (amperios) para estandarizar la separación de isoenzimas usando los estándares respectivos; estableciéndose un valor de 30 mA.; igualmente el tiempo óptimo de corrida fue establecida en 5 horas, en la que se observaba una clara definición de las isoenzimas en el electroforograma.
- b) Se uso buffer de corrida fresco para cada corrida electroforética, y en cada caso se controló el pH.
- c) Se corrieron estándares de isoenzimas en cada uno de los geles y todas fueron realizadas por duplicado.
- d) La posición relativa de cada isoenzima fue determinada siguiendo el patrón mostrado por los estándares, en donde ADA1m correspondía al estándar de lisado

de eritrocitos, la posición de ADA1cp a la mezcla incubada de hematíes lisados con suero normal, y la posición catódica al inicio de la corrida fue para la isoenzima ADA2. tal como muestra la fotografía No 1.

- e) El scanning densitométrico fue realizado por duplicado y se consideraron los valores promedios de actividad.

3.2.6. ANALISIS DE DATOS.

Se realizó en EXCEL ver 7.0 Windows 95 , la prueba estadística empleada fue la de Mann Whitney .

RESULTADOS

RESULTADOS

IV.RESULTADOS

De las 67 historias clínicas revisadas desde setiembre de 1 998 hasta enero del 2000, de los pacientes con valores de adenosina deaminasa mayores de 9 U/L, se encontró que 32.8% (22 casos) correspondían a TBC meníngea confirmada; siguiendo en el orden de frecuencia meningitis por criptococos asociada a VIH con 21 %(14). Tal como se muestra en la tabla No. 1 y Gráfico 1.

Para los casos de TBC meníngea se encontró un ligero incremento en pacientes de sexo masculino (12/22casos) siendo la edad de promedio de 17 años para ambos sexos(rango 3-81 años) (Tabla No. 2)

Se encontró 4 casos de TBC meníngea asociado a VIH , que constituye el 6% de las muestras con valores elevados de adenosina deaminasa; de las cuales el 75% fueron del sexo masculino (Tabla No. 1 y Gráfico No.1).

Por otro lado los casos estudiados desde setiembre de 1 999 hasta enero del 2 000 mostraron un 47% de tuberculosis meníngea (9/19 casos), siguiéndole los casos de MEC por criptococos asociada a VIH (21%) Tabla No. 3 Gráfico No. 3; del total de casos confirmados de TBC meníngea el 44.4%(4) presentaron cultivo

positivo. Tabla No. 4 y Gráfico No.4

En la tabla No5 y Gráfico No.5. Se muestran los resultados de los valores de proteínas; en la que se observa que existe hiperproteinorraquia marcada en ambos grupos (67% para MECTBC y 60% en los otros casos), siendo los niveles de hiperproteinorraquia leve 33% y 40% respectivamente.

Los niveles de glucosa mostraron hipoglucorraquia en ambos grupos con 78% y 80 % para MEC TBC y otras patologías respectivamente (Tabla No. 6 y Gráfico No.6).

Respecto a la celularidad se encontró que un 67% mostró pleocitosis marcada para los casos de MEC TBC y un 20 % para otras enfermedades del SNC; por otro lado un 50% (5) de otras patologías del SNC mostró celularidad normal contra un 0% (0) de los casos de TBC meníngea. Estos datos se muestran en la Tabla No. 7 y Gráfico No7

El recuento diferencial (expresados por valores medios) de los estudios citológicos del grupo de meningitis tuberculosa se presentó como sigue: 92.3% Mononucleares y 7.7% de Polimorfonucleares.

En el análisis comparativo de los casos de TBC meníngea con otras enfermedades del SNC se encontró que los valores medios de los niveles de adenosina deaminasa fueron 22.5 y 13.5 U/L respectivamente. Tabla No. 8 y Gráfico No.8.

El resultado del estudio de isoenzimas para los casos de TBC meníngea fue como sigue: la contribución media de la isoenzima ADA1m fue de 6.78%; de la isoenzima ADA1cp fue de 50.4% y la contribución media de la isoenzima ADA2 fue de 42.71 %; en tanto que en las otras enfermedades del SNC la contribución media fue de 11.38%, 60.79% y 27.83% para las isoenzimas ADA1m, ADA1cp y ADA2 respectivamente. Tabla No. 9 y Gráfico No.9.

El análisis estadístico usando la Prueba de Mann -Withney con un nivel de significancia de 0.10 entre las medianas de valores de ADA total de otras enfermedades del SNC y ADA de TBC meníngea usando como:

- Ho: La mediana de los valores de ADA en otras enfermedades del SNC es mayor que la mediana de los valores de ADA en TBC meníngea.
- Ha : La mediana de los valores de ADA en otras enfermedades del SNC es menor que la mediana de los valores de ADA en TBC meníngea.

Los resultados indican que se rechaza la hipótesis nula (Ho).

El análisis estadístico usando la Prueba de Mann -Withney con un nivel de significancia de 0.10 entre las medianas de valores de la isoenzima ADA1m de otras enfermedades del SNC y ADA1m de TBC meníngea usando como:

- Ho: La mediana de los valores de ADA1m en otras enfermedades del SNC es mayor que la mediana de los valores de ADA1 en TBC meníngea.
- Ha : La mediana de los valores de ADA1m en otras enfermedades del SNC es menor que la mediana de los valores de ADAm en TBC meníngea.

Los resultados indican que se acepta la hipótesis nula (Ho).

El análisis estadístico usando la Prueba de Mann -Withney con un nivel de significancia de 0.10 entre las medianas de valores de la isoenzima ADA1cp de otras enfermedades del SNC y ADA1cp de TBC meníngea usando como:

Ho: La mediana de los valores de ADA1cp en otras enfermedades del SNC es mayor que la mediana de los valores de ADA1cp en TBC meníngea.

Ha : La mediana de los valores de ADA1cp en otras enfermedades del SNC es menor que la mediana de los valores de ADA1cp en TBC meníngea.

Los resultados indican que se acepta la hipótesis nula (Ho).

El análisis estadístico usando la Prueba de Mann -Withney con un nivel de significancia de 0.10 entre las medianas de valores de la isoenzima ADA2 de otras enfermedades del SNC y ADA2 de TBC meníngea usando como:

Ho: La mediana de los valores de ADA2 en otras enfermedades del SNC es mayor que la mediana de los valores de ADA2 en TBC meníngea.

Ha : La mediana de los valores de ADA2 en otras enfermedades del SNC es menor que la mediana de los valores de ADA2 en TBC meníngea.

Los resultados indican que se rechaza la hipótesis nula (Ho).

Tabla N0.1 Frecuencia de Enfermedades del Sistema Nervioso Central con valores Altos de Adenosina Deaminasa HNGAI Setiembre 1998 - Enero 2000

ENFERMEDAD	n	%
MECTBC	22	32,80%
VIH CRIPTOCOCOS	14	21,00%
VIH	6	9,00%
MEC VIRAL	5	7,40%
MEC TBC VIH	4	6,00%
Neurocisticercosis	3	4,40%
OTROS	13	19,40%
TOTAL	67	100,00%

otros (abceso cerebral, meningioma extramedular, mielitis transversa, síndrome de compresión medular, etc)

Gráfico No.1 Frecuencia de Enfermedades del Sistema Nervioso Central con valores Altos de Adenosina Deaminasa HNGAI Setiembre 1998 - Enero 2000

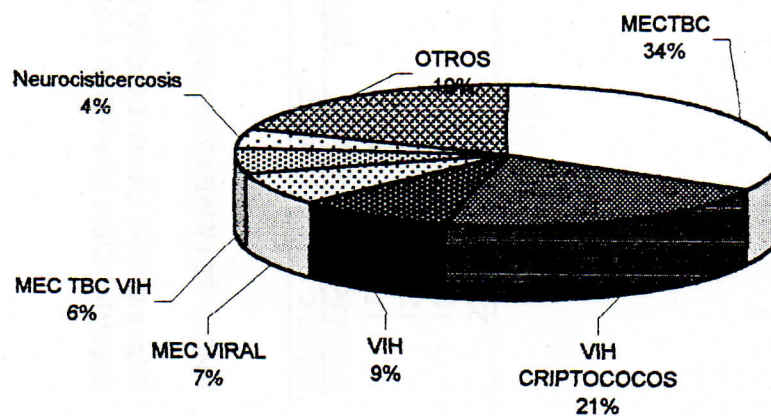


Tabla No. 2 DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO DE PACIENTES CON COMPROMISO DEL SNC
CON NIVELES PATOLOGICOS DE ADENOSINA DEAMINASA

HNGAI SETIEMBRE DE 1998 - ENERO 2000

VARIABLE	MECTBC	VIH CRIPTO	VIH	MEC VIRAL	MEC TBC	VIH	NEUROCIST	OTROS	TOTAL
EDAD (RANGO)	3-81 Años	29-64 años	28-45 años	1-64 años	38-67 Años	28-67 años	11-84 años		
EDAD PROMEDIO	17	41	42	31	42	45	46		
MASCULINO	12	10	6	3	3	1	8		43
FEMENINO	10	4	0	2	1	2	5		24
TOTAL	22	14	6	5	4	3	13		67

Tabla No.3 Frecuencia de Enfermedades con
Niveles Elevados de Adenosina
Deaminasa (Mayor de 9 U/L)
HNGAI Setiembre 1999 Enero 2000

Enfermedades	n	%
MEC TBC	9	47,31
MEC criptococos VIH	4	21,04
Síndrome de Compresión Medular	2	10,52
Toxoplasmosis	1	5,26
Neurocisticercosis	1	5,26
VIH Herpes Zoster	1	5,26
MEC Viral	1	5,26
TOTAL	19	100%

Gráfico No.3 Frecuencia de Enfermedades con
Niveles Elevados de Adenosina
Deaminasa (Mayor de 9 U/L)
HNGAI Setiembre 1999 Enero 2000

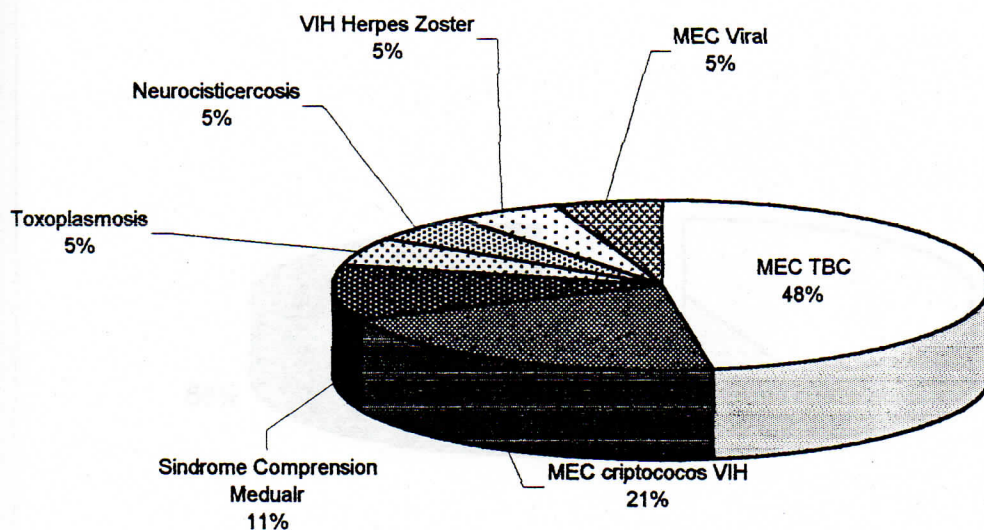
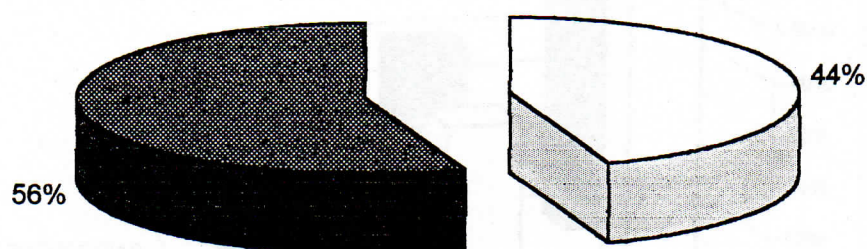


Tabla No. 4. Casos Confirmados de Tuberculosis
Menígea y Cultivos Positivos
HNGAI Setiembre 1999 enero 2000

CULTIVO	n	%
POSITIVO	4	44,40%
NEGATIVO	5	55,60%
TOTAL	9	100%

Gráfico No. 4 Casos Confirmados de Tuberculosis
Menígea y
Cultivos Positivos
HNGAI Setiembre 1999 enero 2000



□ POSITIVO ■ NEGATIVO

**Tabla No.5 Niveles de Proteinas en LCR en TBC
Menígea y otras Patologías
HNGAI Setiembre 1999 Enero 2000**

PROTEINAS	MEC TBC		OTRAS PAT SNC		TOTAL
	n	%	n	%	
0.10-0.40 g/L	0	0%	0	0%	0
0.40-1.00 g/L	3	33%	4	40%	7
> 1.0 G/L	6	67%	6	60%	12
TOTAL	9	100%	10	100%	19

**Gráfico No.5 Niveles de Proteinas en LCR en
TBC Menígea
y otras Patologías
HNGAI Setiembre 1999 Enero 2000**

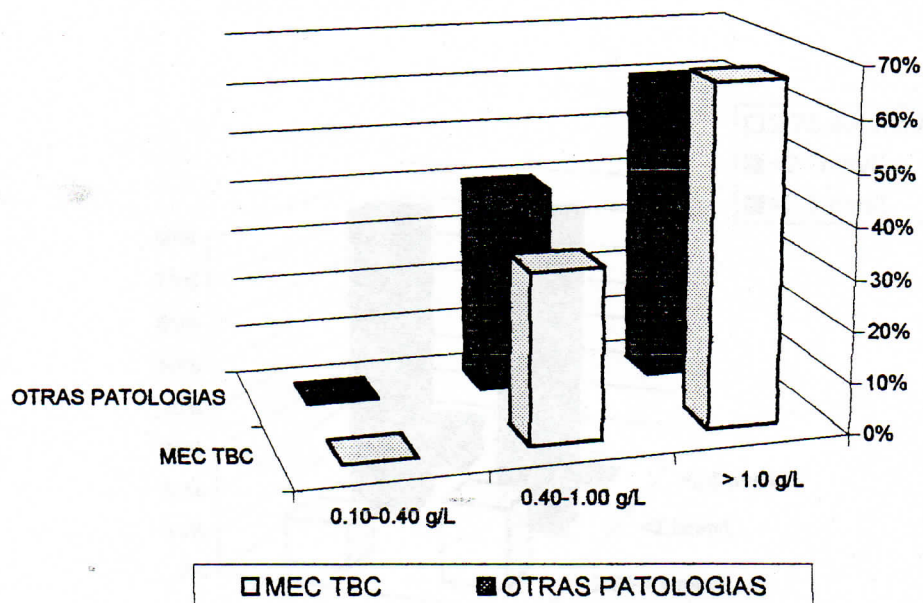
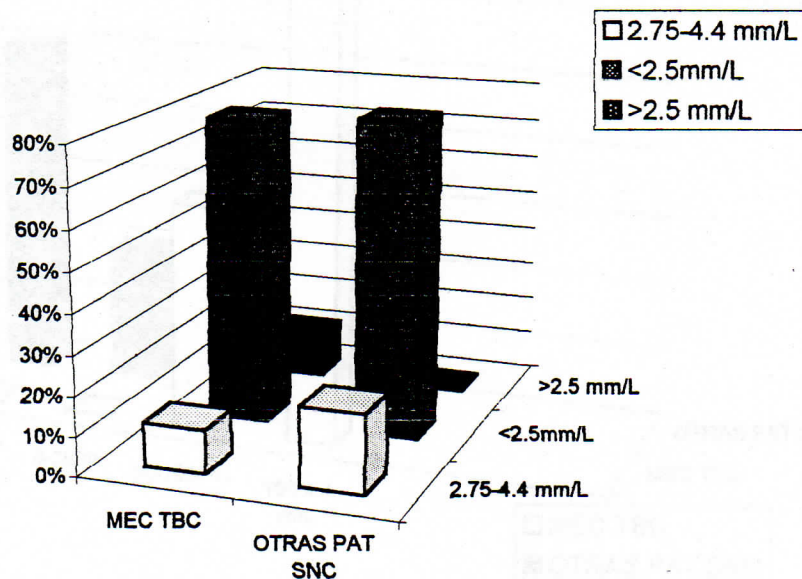


Tabla No. 6 Niveles de Glucosa en TBC Meníngea y Otras Patologías del SNC
HNGAI Setiembre 1999 Enero 2000

GLUCOSA	MEC TBC		OTRAS PAT SNC		TOTAL
	n	%	n	%	n
2.75-4.4 mm/L	1	11%	2	20%	3
<2.5mm/L	7	78%	8	80%	15
>2.5 mm/L	1	11%	0	0%	1
TOTAL	9	100%	10	100%	19

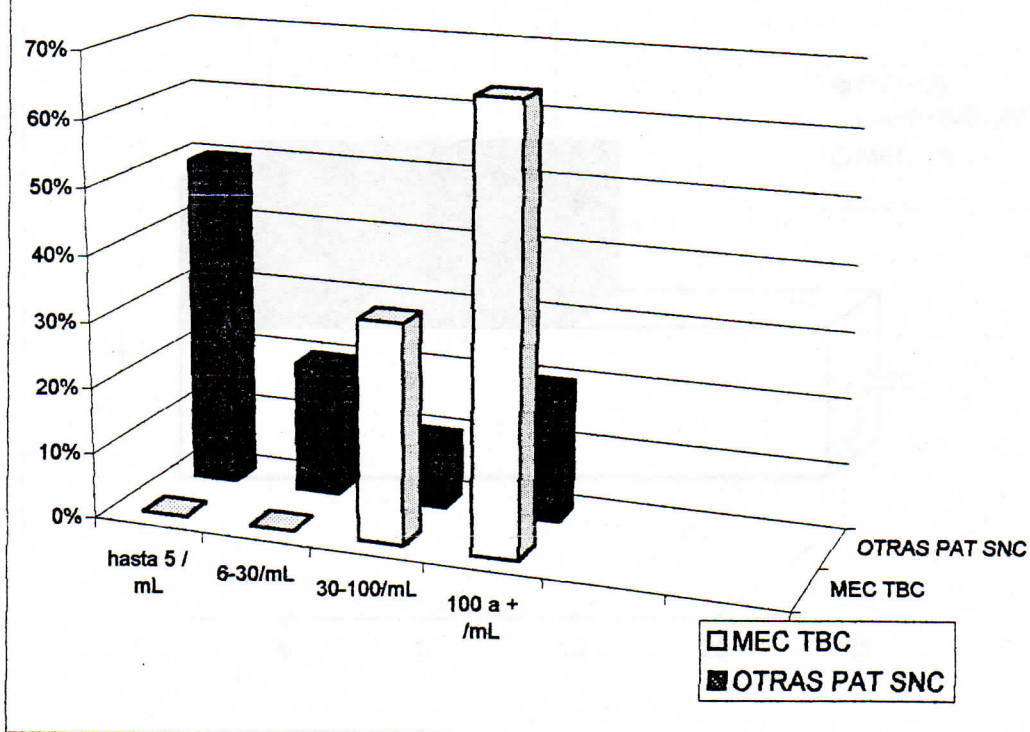
Gráfico No. 6 Niveles de Glucosa en LCR en TBC Meníngea y Otras Patologías del SNC
HNGAI Setiembre 1999 Enero 2000



**Tabla No. 7 Celularidad en TBC Meníngea y otras
Patologías del SNC en LCR
HNGAI Setiembre 1999 Enero 20000**

CELULARIDAD	MEC TBC		OTRAS PAT SNC		TOTAL
	n	%	n	%	
Normal hasta 5 / mL	0	0%	5	50%	5
Pleocitosis ligera (6-30/mL)	0	0%	2	20%	2
Pleocitosis moderada (30 -1	3	33%	1	10%	4
Pleocitosis marcada (100 a +	6	67%	2	20%	8
TOTAL	9	100%	10	100%	19

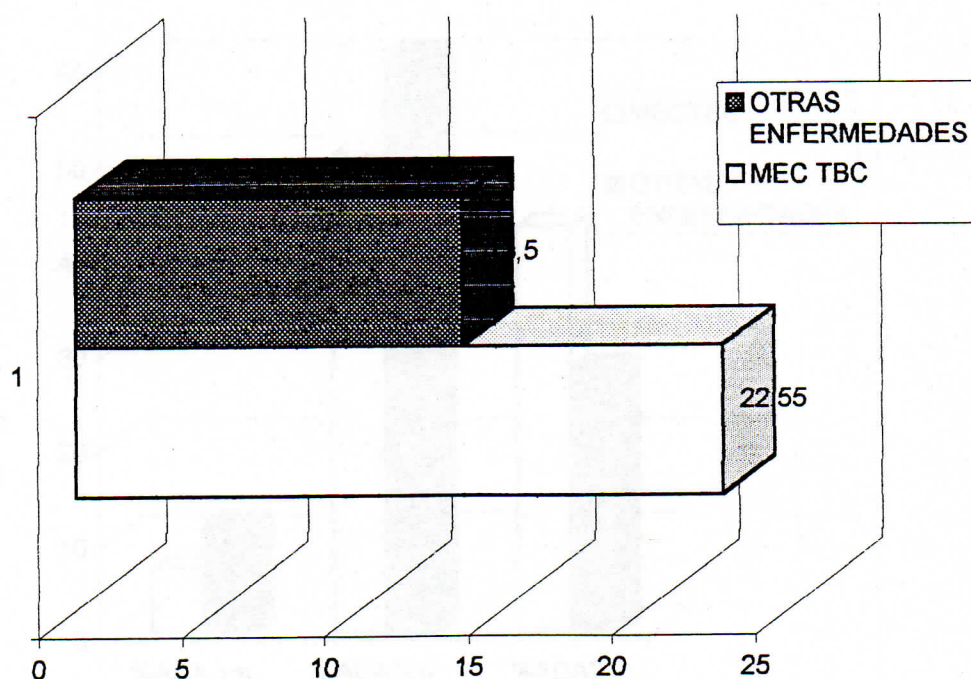
**Gráfico No.7 Celularidad en TBC Meníngea y otras
Patologías
del SNC en LCR
HNGAI Setiembre 1999 Enero 20000**



**Tabla No.8 Valores medios de Adenosina Deaminasa
en Líquido Cefalorraquideo en TBC Meníngea
y otras Patologías del SNC
HNGAI Setiembre 1999- Enero 2000**

ACTIVIDAD TOTAL	MEC	TBC	OTRAS PATOLOGIAS	
	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO
(Colorimetrico)	22,55	13.9-55.1	13,5	9.2-16.8

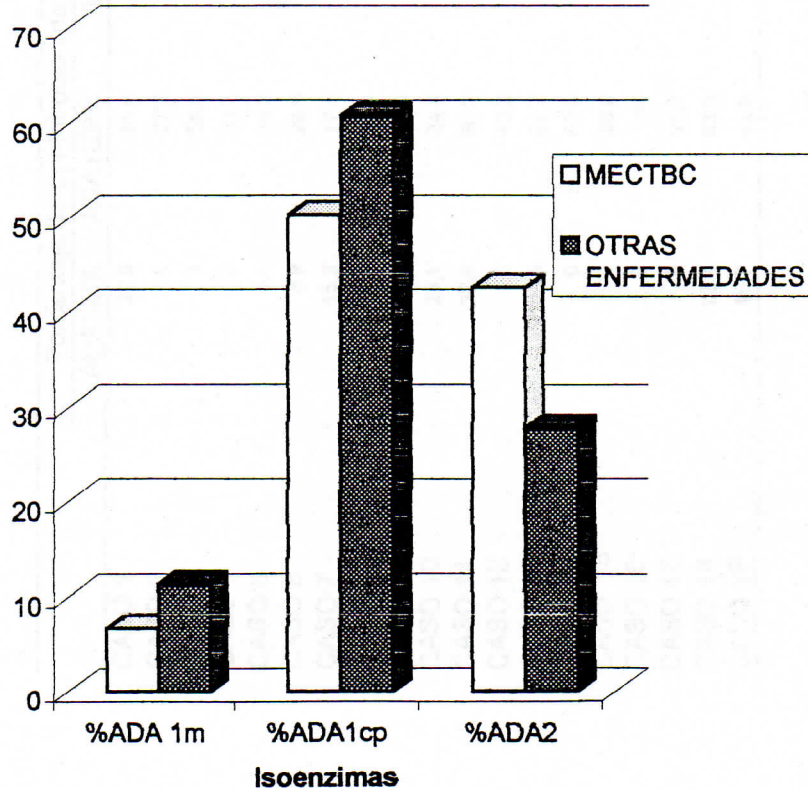
**Gráfico No.8 Valores medios de Adenosina
Deaminasa
en Líquido Cefalorraquideo en TBC Meníngea y otras
Patologías del SNC
HNGAI Setiembre 1999- Enero 2000**



**Tabla No. 9 Porcentaje de Contribucion de Cada
isoenzima al nivel de ADA total por patologias
HNGAI Setiembre 1999- Enero 2000**

Porcentaje de Contribucion	MEC TBC		OTRAS ENFERMEDADES	
	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO
%ADA1m	6,78	0-22.1	11,38	0-32.6
%ADA1cp	50,4	17.8-89.3	60,79	24.6-100
%ADA2	42,71	10-72.5	27,83	0-59.7

**Gráfico No. 9 Porcentaje de Contribucion de
Cada isoenzima al nivel de ADA
total por patologias
HNGAI Setiembre 1999- Enero 2000**



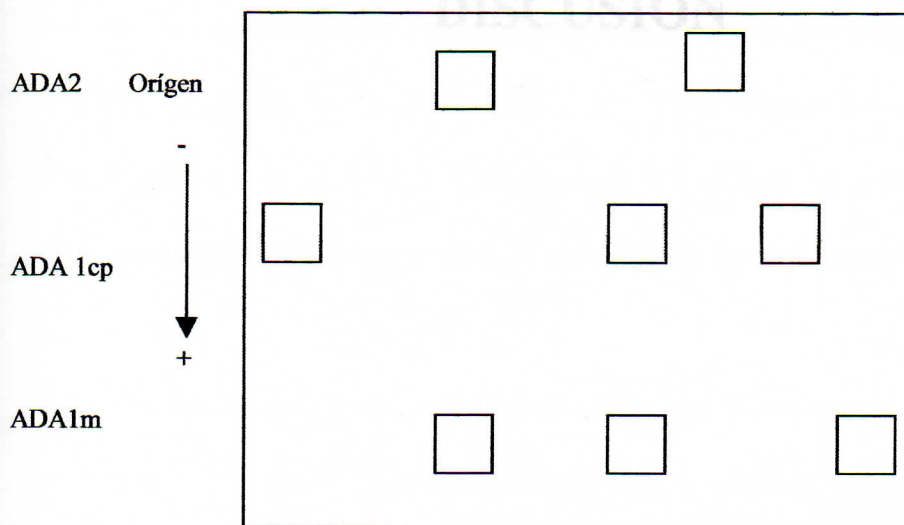
**Tabla 9a. Contribución de Cada Isoenzima ADA a la actividad Total
Caso por caso por patologías.
HNGAI Setiembre 1999 - Enero 2000**

	Porcentaje de Contribución de cada isoenzima			DIAGNOSTICO
	ADA1M%	ADA1CP%	ADA2%	
CASO 1	22,9	51,6	25,5	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 2	0	27,5	72,5	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 3	1	55,8	43,3	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 4	0	89,3	10	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 5	5,7	35,2	59,1	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 6	8,9	24,5	66,6	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 7	15,3	17,8	66,9	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 8	7,3	67,1	25,7	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 9	0	82,2	17,8	TUBERCULOSIS MENINGEA
CASO 10	23,1	24,6	52,3	CRIOQCOCOSIS MENINGEA + VIH
CASO 11	32,8	60,2	7,2	CRIOQCOCOSIS MENINGEA + VIH
CASO 12	0	40,3	59,7	CRIOQCOCOSIS MENINGEA + VIH
CASO 13	15	62,7	22,3	CRIOQCOCOSIS MENINGEA + VIH
CASO 14	0	62,6	37,5	COMPRESION MEDULAR
CASO 15	0	60,9	39,1	COMPRESION MEDULAR
CASO 16	0	100	0	TOXOPLASMOSIS CEREBRAL
CASO 17	0	95,7	4,3	NEUROCICTERICOSIS
CASO 18	23,4	63,3	13,3	VIH C3 HERPES
CASO 19	19,7	42,6	37,7	MENINGITIS VIRAL

Separación de las Isoenzimas ADA en LCR por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE)



Representación Esquemática de las tres formas moleculares de ADA



El presente esquema muestra la posición relativa de cada isoenzima, así la isoenzima ADA2 tiene posición catódica (inicio de la corrida); La isoenzima ADA1cp se localiza en la posición intermedia; en tanto que la posición de la isoenzima ADA1m es anódica.

El scanning densitométrico se presenta en ANEXOS

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La tuberculosis es una enfermedad muy frecuente en los países en vías de desarrollo; en nuestro medio, según las referencias de la OMS en 1996 se presentó 26 800 casos con una tasa de 11,9 x 100 000 habitantes y se observa una tendencia de aumento desde 1985 hasta 1992 en que se observa una curva descendente mantenida hasta 1996 en que se datan los últimos registros^{26,27}.

La TBC meníngea se suele presentar como una extensión de la enfermedad pulmonar. Los datos estadísticos demográficos indican que se presentó en aumento desde 1985 a 1992, según el programa de control de tuberculosis del Ex Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS) actualmente EsSalud; así mismo indica que los casos se incrementaron a 26, por año lo que significó un aumento de la frecuencia de esta enfermedad⁴.

El diagnóstico de TBC meníngea se realiza por medio del cuadro clínico que

manifiesta el paciente entre los que resaltan los signos clínicos meníngeos y neurológicos ^{14,15}. Los resultados del estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con TBC meníngea por el laboratorio, indican pleocitosis marcada a predominio mononuclear, hiperproteíorraquia e hipoglucoorraquia marcada ^{15,16}.

Actualmente se utiliza el test de ADA como herramienta de ayuda al diagnóstico de la TBC meníngea en LCR a partir del estudio de Barbieri ⁴, quien indica un valor de corte de 9 U/L, sin embargo otras enfermedades como la meningitis bacterianas, toxoplasmosis cerebral, criptococosis meníngea y otras enfermedades no infecciosas como la hemorragia subaracnoidea, presentan niveles considerablemente elevados de la enzima ADA, como lo indica Chawla ⁹, lo cual limita la diferenciación del tipo de enfermedad o cuadro que presenta el paciente, es por ello que es necesaria una mejor ubicación de los niveles de ADA para lograr su utilidad diagnóstica diferencial.

La enzima ADA, (adenosina deaminasa) tiene tres isoenzimas, como se ha mencionado en el capítulo de introducción, estas son ADA1m, ADA1cp y ADA2 ^{6, 9,17,21,34,35}. Se han reportado diversos estudios respecto a la variación de la actividad de las isoenzimas ADA en diferentes entidades clínicas en líquido pleural ³⁵, suero ^{21,34}, líquido ascítico ^{34,35}, de manera tal que siendo el LCR también un fluido biológico en el que se presenta actividad ADA, puede entonces existir un perfil de actividad de las isoenzimas de esta enzima, que diferencie a la TBC meníngea de otras enfermedades del SNC; esta es la razón de esta investigación.

En la revisión de las historias clínicas que datan de setiembre de 1998 a Enero de 2000 realizada en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, se encontró una incidencia relativamente elevada de TBC meníngea en muestras de LCR con valores elevados de adenosina deaminasa (mayor de 9 U/L); la mayor frecuencia en pacientes VIH positivo con meningitis fue para criptococosis cerebral; en contraste a lo hallado por Castro⁸ en un estudio realizado en el Hospital Nacional 2 de Mayo en la que encontró una mayor frecuencia para TBC meníngea en pacientes VIH positivos⁸

El análisis posterior de los datos desde setiembre de 1999 a enero de 2000, mostró una mayor frecuencia de los casos de TBC meníngea, lo cual indicaría un incremento en los casos, que estaría supeditado a otras investigaciones para determinar las causas de tal incremento.

Dado que la presente investigación tuvo como objetivo cuantificar las isoenzimas ADA y observar el perfil de actividad en LCR de pacientes con TBC meníngea y otras enfermedades, se tuvo que realizar la estandarización de la técnica de separación electroforética de las isoenzimas, técnica final ajustada que se muestra en material y métodos como una modificación del método de Ungerer^{34,35}, y posteriormente el revelado de la actividad enzimática usando la metodología planteada por Buel y McQuarrie⁶ mod. Ungerer³⁴.

Algunos estudios demuestran que el test de ADA total como diagnóstico, tiene una sensibilidad de 65 hasta 100%, para TBC meníngea; pero, como se refirió anteriormente, también se encuentra incrementada en otras enfermedades, lo cual

limita su uso diagnóstico.^{9,31} Esto indica que para el diagnóstico de TBC meníngea es necesario realizar otras pruebas más específicas como estudios de isoenzimas, o el diagnóstico sobre la base de la respuesta al tratamiento farmacológico.

Los estudios de Chawla indican que la adenosina deaminasa en LCR de las meningitis tanto tuberculosa como bacteriana puede ser como resultado de un daño parcial de la barrera hematoencefálica lo cual permite el ingreso de la enzima ADA del plasma o del tejido cerebral al líquido cefalorraquídeo⁹, aunque existe controversia al respecto ya que otros indican que esta enzima ADA es autóctona del LCR y es producida en el caso de meningitis tuberculosa por macrófagos presentes en el fluido, indicando además que el tejido cerebral no tiene la isoenzima ADA2¹⁷, por lo tanto para una correcta interpretación es necesario distinguir entre ADA1 y ADA2, dicha separación se pueden lograr por medio de técnicas electroforéticas, visualización por medio del revelado enzimático y la medición de la contribución de cada isoenzima a la actividad ADA total, por método densitométrico, aspectos desarrollados en esta investigación.

Los resultados de la presente investigación han demostrado que los patrones electroforéticos de las isoenzimas de ADA en geles unidimensionales no denaturantes, obtenidas de LCR con valores ADA mayores de 9U/L, presentan una significativa variación en el nivel de cada una de las isoenzimas (ver cuadro N°9 gráfico N°9 y fotografía N°1); estos patrones electroforéticos son similares a los encontrados por otros investigadores como Gakis¹⁷, Ungerer^{34,35} y Kobayashi²¹

con la diferencia de que dichos estudios fueron realizados en otras efusiones y fluidos corporales; esto demuestra la presencia de las tres isoenzimas de ADA a nivel de LCR, una que se localiza en el punto de aplicación u origen de la corrida electroforéticas que corresponde a la ADA2, en posición intermedia la ADA1cp y en posición aniónica la ADA1m.

Se puede afirmar que el origen del incremento de la actividad ADA en LCR de pacientes con TBC meníngea es debido al predominio celular mononuclear. Es conocido que los linfocitos y monocitos presentan una mayor actividad ADA que otros tipos celulares y tejidos³⁵ y que en la TBC meníngea la mayor contribución a la actividad ADA total es debida a ADA1m producida por los linfocitos y monocitos y ADA2 producida por monocitos. Empero, los resultados electroforéticos encontrados en esta investigación, muestran una escasa o ninguna actividad ADA1m y mayor actividad ADA1cp, esto podría explicarse por la presencia de un exceso de cp (proteína combinante) en LCR, que probablemente proviene del plasma, a consecuencia del daño de la barrera hematoencefálica, como lo indica Chawla⁹ o del proceso inflamatorio existente como lo refiere Gakis¹⁷, sea de una u otra forma, esta proteína cp de alto peso molecular, se encuentra en altas concentraciones en plasma, y al pasar al LCR permite la formación de ADA1cp a expensas de ADA1m como lo indica Ungerer³⁴.

La presencia de proteína combinante (cp) en LCR puede ser explicada por el daño de la barrera hematoencefálica evidenciado por la hiperproteinorraquia marcada; tal como se ve en la tabla N°5 y gráfico N°5, que permite el paso de cp desde el plasma al LCR; a menos que se demuestre lo contrario, es decir que existe proteína combinante cp

autóctono en LCR.

La isoenzima ADA1cp también aparece incrementada en otras enfermedades del SNC, por lo cual, para una correcta interpretación es necesario tomar en cuenta los valores de actividad enzimática de ADA2,

Según la prueba de Mann Whitney se encontró que las medianas de las actividades de ADA total en LCR de pacientes con TBC meníngea son mayores que las actividades del LCR de otras enfermedades parainfectivas del SNC (ver anexo N°2). De otro lado usando la misma prueba para los valores de ADA1m y ADA1cp se encontró que estaban disminuidas en TBC meníngea, respecto a otras enfermedades del SNC. Los niveles de ADA2 mostraron un incremento en LCR de pacientes con TBC meníngea respecto de otras enfermedades del SNC, con significancia estadística, lo que demuestra que esta prueba se puede usar para coadyuvar al diagnóstico diferencial de TBC meníngea.

VI CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

La electroforesis es una herramienta que permite distinguir las isoenzimas ADA, la cual es producida principalmente por la población leucocitaria mononuclear en LCR

La isoenzima ADA1m tiene poca contribución de la actividad ADA total tanto en LCR de pacientes con TBC meníngea y otras enfermedades del SNC.

La isoenzima ADA1cp se encuentra incrementada tanto en LCR de pacientes con TBC meníngea y otras enfermedades del Sistema Nervioso.

La determinación de isoenzima ADA2 en LCR ofrece ayuda para el diagnóstico de TBC meníngea por estar incrementada (42% de actividad de ADA total), con respecto a otras enfermedades del SNC (27% de actividad ADA total).

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Akedo H, Nishihara H, Shinkai K, Komatsu K, Ishikawa S.** Multiple forms of human Adenosine Deaminase. *Biochim Biophys Acta* 1972; 276: 257-271.
2. **Andrews A. T.** Electrophoresis Theory. Techniques and Biochemical and Clinical Applications. Second Edition. Edit Clarendon Press. Oxford. 1986. Pag 24.
3. **Astigarraga J.** Estudio de la Enzima Adenosín Deaminasa en LCR en la Infancia. *Rev Esp Ped* 1991; 47: 31-36.
4. **Barbieri R.** Determinación de Actividad de Adenosina Deaminasa en Líquidos Biológicos, para el diagnóstico de la Tuberculosis Pulmonar y Extrapulmonar. Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. (Tesis para optar el Post-Grado en Patología Clínica). Lima Perú: UNMSM. 1994. Código ME/QZ/40/B23.
5. **Berenguer J, Moreno S, Laguna F, Vicente T.** Tuberculosis Meningitis in patients with the human immunodeficiency virus. *New Eng J Med* 1992; 326: 668-672.

6. **Buel E, Mac Quarrie.** Purification of Adenosine Deaminase from Human Red Blood Cell. *Preparative Biochemistry* 1981; 11: 363-380.
7. **Carstens M, Burgess L, Maritz F, Talijsaard J.** Isoenzymes of adenosine deaminase in pleural effusions: a diagnostic tool? . *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 831-835.
8. **Castro J.** Comportamiento de la Adenosina Deaminasa en Líquido Cefalorraquídeo de pacientes con HIV. Lima-Perú. Tesis para optar el título de la especialidad de Patología Clínica. Lima Perú: UNMSM. 1998. Código PE 13.1/Tesis Br. 8371.
9. **Chawla R, Seth R, Raj B, Saini A.** Adenosine deaminase levels in cerebrospinal fluid in tuberculosis and bacterial meningitis. *Tubercle* 1991; 72: 190-192.
10. **Conde Y.** Células en el Líquido Pleural. Su valor en el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales. *Rev Clin Esp* 1994; 173.
11. **Donma M, Donma O.** Diagnostic Efficacy of Adenosine Deaminase for Future Therapeutic Approaches in Immunodeficiency Disorders. *LabMedica International* March- April 1999; 16-19.
12. **Egido J, Gonzales J, Cuba E.** False positive of ADA determination in CSF. *Acta Neurol (Napoli)* 1994; 16: 288-290.

13. **Ena J, Crespo J, Valls V.** Adenosine Deaminase Activity in cerebrospinal fluid a useful test for meningeal tuberculosis in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1988; 158: 4.
14. **Farga V.** Tuberculosis. Segunda edición. Mediterráneo. Santiago de Chile. 1992. p. 71.
15. **Farreras P, Rozman C.** Medicina Interna. Decimotercera edición. Editorial Harcourt Brace. España. 1997. p. 1418.
16. **Fishman A.** Tratado de Neumología. Segunda edición. Editorial Doyma. Barcelona. 1991. p. 1716
17. **Gakis C.** Adenosine deaminase levels in cerebrospinal fluid in tuberculosis and bacterial meningitis. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76: 372-373.
18. **Guyton Arthur C.** Tratado de Fisiologia Medica. Octava edicion. Ed Interamericana Mc Graw Hill . Madrid España. 1992. p. 712-717.
19. **Helena Labs** Interpretative Guide to Clinical Electrophoresis 2nd Edition 1998.
20. **Holdings M.** Manejo de la Meningitis Tuberculosa. *Drugs* 1990; 39: 224-233.
21. **Kobayashi F, Ikeda T, Marumo F, Sato Ch.** Adenosine Deaminase

- Isoenzymes in Liver Disease. Am J Gastroent 1993; 2: 266-271.
22. **Mak W, Cheung R, Ho S, Tsang K, Fong G.** Tuberculous meningitis in Hong Kong: experience in a regional hospital. Int J Tuberc Lung 1998; 2: 1040-1043.
23. **Mejía A. Pajares V. Fernández A.** Adenosina deaminasa sérica como marcador de la respuesta terapéutica en TBC pulmonar. Diagnóstico 1998; 37: 328-334.
24. **Murray P.** Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology. First ed. California, 1995. p. 425 - 441.
25. **Murray R. Mayes P, Granner D, Rodwell V.** Bioquímica de Harper Decimosegunda Edición. Editorial Manual Moderno. México 1992. p. 66
26. **OPS.** La Salud en las Américas. Volumen I. Edición de 1998. Publicación científica No 569. p. 137-138.
27. **OPS.** La Salud en las Américas. Volumen II. Edición de 1998. Publicación científica No 569. p.462.
28. **Pineda J. Borja N. Rodriguez N.** El Control de la Tuberculosis en la población asegurada en el Perú. Ciencia y Tecnología 1994; 3:5-9.
29. **Ribera E, Martínez J, Ocaña I, Ruiz I, Jiménez J, Encabo G, Segura R, Pascual C.** Diagnostic value of ascites gamma interferon levels in tuberculous

- peritonitis. Comparison with adenosine deaminase activity. *Tubercle* 1991; 72: 193-197.
30. **Ribera E.** Activity of Adenosine Deaminase in Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis and Follow up of Tuberculosis Meningitis in Adults. *J Infect Dis* 1987; 155: 603-607.
31. **Sánchez J, Pérez E, Jiménez A, Martín P, Roca V, Ruiz M, Romero J, Palau E, Picazo J.** Tuberculous Meningitis. Clinical Characteristics and Comparison With Cryptococcal Meningitis in Patients With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Arch Neurol* 1996; 53: 671-676.
32. **Saravia de Cunha, Gaspar E, Melico-Silvestre A.** Neurobrucellosis - another cause of increased adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1990; 161: 156-157.
33. **Sociedad Peruana de Medicina Interna. IX Congreso Nacional de Medicina Interna.** Actividad de Adenosina Deaminasa en LCR para el Diagnóstico de Meningitis Tuberculosa. Lima-Perú. 1996.
34. **Ungerer J, Oosthuizen H, Bissbort S, Vermaak W.** Serum Adenosine Deaminase: Isoenzymes and Diagnostic application. *Clin Chem* 1992; 38:1322-1326.
35. **Ungerer J, Oosthuizen H, Retief J, Bissbort S.** Significance of Adenosine

Deaminase Activity and Isoenzymes in Tuberculous Effusions. *Chest* 1994; 106: 33-37.

36. **Van Der Weyden M, Kelley W.** Human Adenosine Deaminase. Distribution and Properties. *J. Biol. Chem.* 1976; 251: 5448-5456.

37. **Villa L.** Efectividad de la Adenosna deaminasa (ADA) en Líquido Cefalorraquídeo para el Diagnóstico de Infección Tuberculosa del Sistema Nervioso Central. *Acta Med Colomb.* 1994; 19: 250.

ANEXOS

ANEXOS

TÉCNICA DEL TEST DE ADA TOTAL

TÉCNICA DEL TEST DE ADA

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

BUFFER FOSFATO

50mM: pH: 6.5

Fosfato ácido monosódico monohidratado (Sigma n-A-0751) = 4.7.

Fosfato ácido disódico dodecahidratado (B.A-1-3822) = 5.62 g.

Disolver en agua bidestilada y completar el volumen a 1000c

Ajustar el pH a 6.5

Mantener este reactivo en un ambiente libre de contaminación con amonio

SOLUCIÓN BUFFER DE ADENOSINA

En un matraz de 25 ml

Buffer fosfato I = 15 mL.

Adenosina = 140 mg

Disolver a 60°C en un baño maria

Enfriar en agua corriente

Completar el volumen de 25 mL con Buffer fosfato

(NO ALMACENAR)

SOLUCIÓN STOCK DE SULFATO DE AMONIO

(15nM)

Sulfato de Amonio Anhidro (B.A-3512) = 1.982 g.

Disolver en agua bidestilada

Completar a 1000 mL.

Mezclar completamente.

SOLUCIÓN STANDAR DE SULFATO DE AMONIO

Solución stock de sulfato de amonio = 0.5 mL

Buffer fosfato = 100 mL

Concentración 50 U/L

SOLUCIÓN DE NITROPRUSIATO FENOL /16 nM FENOL Y 0.17 nM NITROPRUSIATO DE SODIO.

Fenol = 10 g

Nitroprusiato de Sodio = 50 mg

Disolver completamente 500 ml

Completar hasta 1000 mL con agua bidestilada.

SOLUCIÓN ALCALINA DE HIPOCLORITO DE SODIO (11nM NaOCl; 125nM NaOH)

Hidróxido de sodio = 125 ml

Clorox = 16.4

Completar a 1000 mL con agua bidestilada

CONSERVAR ESTOS REACTIVOS EN FRASCO ÁMBAR Y A UNA TEMPERATURA DE 4 °C.

TEST DE ADA

MUESTRAS:

Se realiza la determinación de ADA en las siguientes muestras

Líquido pleural, Líquido peritoneal, Líquido pericardico, líquido cefalorraquídeo

Todas las muestras no deben contener signos de hemólisis

TÉCNICA

	Blanco Reactivo	Estándar	Blanco Muestra	Muestra
Buffer Fosfato I	0.4 ml	-	-	-
Buffer adenosina II	-	-	0.4ml	0.4ml
Estándar 50 U/l	-	0.4 ml	-	-
Muestra	-	-	-	20ul

Mezclar y tapar con parafilm. Incubar por 60 minutos a 37°C en baño maria.

Solución de

nitroprusiato

de fenol	1.2ml	1.2ml	1.2ml	1.2ml
----------	-------	-------	-------	-------

Muestra			20 ul	
---------	--	--	-------	--

Solución alcalina de

hipoclorito	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
-------------	--------	--------	--------	--------

Mezclar e incubar por 30 minutos a 37 °C en baño maría

Leer contra blanco de reactivo a 620 nm

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Actividad enzimática = lectura de la muestra x factor

Las lecturas superiores a 1000 se diluyen en buffer fosfato. Y se multiplica la dilución por el resultado.

ANALISIS ESTADISTICO
COMPARACION DE LAS MEDIANAS DE LOS VALORES DE
ADA TOTAL EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.
Los resultados son los que se muestran a continuación

NIVELES DE ADA TOTAL EN LCR	
OTRAS ENFERMEDADES(X)	TBC MENINGEA(Y)
14,9	13,9
11,8	16,1
9,2	55,3
12,7	23,4
14,9	17,4
11,3	21,4
10,3	13,9
19	21,3
14,3	20,3
16,8	

HIPOTESIS:

- Ho La mediana de los valores de ADA total en LCR
en otras enfermedades \geq la mediana de los valores de
ADAtotal en TBC
- Ha La mediana de los valores de ADAtotal en LCR
de otras enfermedades del SNC $<$ las medianas de los
valores de ADAtotal en TBC meningeas

TABLA DE DATOS Y RANGOS ORIGINALES

x	Rango	y	Rango
9,2	1		
10,3	2		
11,3	3		
11,8	4		
12,7	5		
		13,9	6,5
		13,9	6,5
14,3	8		
14,7	9		
14,9	10		
		16,1	11
16,8	12		
		17,4	13
19	14		
		20,3	15
		21,3	16
		21,4	17
		23,4	18
		55,3	19
TOTAL =		68	

La estadística de Prueba es: La Prueba U de Mann Withney

$$T = S - \frac{n(n+1)}{2}$$

Donde n es es número de observaciones de la muestra X y S la suma de los rangos asignados a las pobservaciones de la muestra de poblacion de valores de X

Si la mediana de de la poblacion X es mas pequeña que la mediana de la población Y tal como se especifica en la hipotesis alterna, es de esperar que la suma de los rangos asignados a las observaciones de la población X sea menor que la suma de los rangos asignados a las observaciones de la población Y. El razonamiento es que un valor de T suficientemente pequeño causará que se rechace la hipotesis $H_0: M_x \geq M_y$

Calculando se tiene un valor de $T = 25$

Cuando se observa la tabla M con $n = 10$ (numero de valores x)
 $m = 9$ (número de valores y) se tiene un valor $W_a = 29$

DECISION:

Como $T < W_x$ se rechaza la hipotesis nula.

CONCLUSION:

Como no se rechaza la hipótesis alterna. se tiene que los valores de ADA en otras enfermedades del SNC son menores que en TBC meníngea

$$0.005 > p > 0.001$$

ANALISIS ESTADISTICO

COMPARACION DE LAS MEDIANAS DE LOS VALORES DE ADA1m EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.

Los resultados son los que se muestran a continuación

NIVELES DE ADA1m EN LCR	
OTRAS ENFERMEDADES(X)	TBC MENINGEA(Y)
23,1	22,9
32,6	0
0	1
15	0
0	5,7
0	8,9
0	15,3
0	7,3
23,4	0
19,7	

HIPOTESIS:

- Ho La mediana de los valores de ADA1m en LCR en otras enfermedades \geq la mediana de los valores de ADA1m en TBC
- Ha La mediana de los valores de ADA1m en LCR de otras enfermedades del SNC $<$ las medianas de los valores de ADA1m en TBC meningea

TABLA DE DATOS Y RANGOS ORIGINALES

X	rango	y	rango
0	4,5		
0	4,5		
0	4,5		
0	4,5		
0	4,5		
		0	4,5
		0	4,5
		0	4,5
		1	9
		5,7	10
		7,3	11
		8,9	12
15	13		
		15,3	14
19,7	15		
		22,3	16
23,1	17		
23,4	18		
32,6	19		

total 104,5

La estadística de Prueba es: La Prueba U de Mann Withney

$$T = S - \frac{n(n+1)}{2}$$

Siguiendo el procedimiento descrito en la página anterior :

Calculando se tiene un valor de $T = 49.5$

Cuando se observa la tabla M con $n = 10$ (número de valores x)

$m = 9$ (número de valores y) se tiene un valor $W_a = 29$

DECISION:

Como T es $> W_x$ no se rechaza la hipótesis nula.

CONCLUSION:

Como no se rechaza la hipótesis nula. se tiene que

La mediana de los valores de ADA1m en LCR

en otras enfermedades \geq la mediana de los valores de ADA1m en TBC

ANALISIS ESTADISTICO
COMPARACION DE LAS MEDIANAS LOS VALORES DE
ADA1cp EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

NIVELES DE ADA1 cp	
OTRAS ENFERMEDADES (X)	TBC MENINGEA (Y)
24,6	51,6
60,2	27,5
40,3	58,8
62,7	89,3
62,5	35,2
60,9	24,5
100	17,8
95,7	67,1
63,3	82,2
37,7	

HIPOTESIS

- Ho La mediana de los valores de ADA1cp en LCR
en otras enfermedades $> \text{ó}$ = la mediana de los valores de
ADA1cp en Tuberculosis meníngea.
- Ha La mediana de los valores de ADA1cp en LCR
de otras enfermedades del SN es $<$ las medianas de los
valores de ADA1cp en TBC meníngea

TABLA DE DATOS Y RANGOS ORIGINALES			
x	rango	y	rango
		17,8	1
		24,5	2
24,6	3		
		27,5	4
		35,2	5
37,7	6		
40,3	7		
		51,6	8
		58,8	9
60,2	10		
60,9	11		
62,5	12		
62,7	13		
63,3	14		
		67,1	15
		82,2	16
		89,3	17
95,7	18		
100	19		

TOTAL = 103

La estadística de Prueba es la Prueba U de MannWhitney

$$T = S + \frac{n(n+1)}{2}$$

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente se obtiene

Un valor de $T = 58$

Cuando se observa en la tabla con $n = 10$ (número de valoresx)

$m = 9$ (número de valores y) se tiene un valor de $W_a = 29$

DECISION

Como T es $> W_x$ No se rechaza la hipótesis nula

CONCLUSION

Como no se rechaza la hipótesis nula se tiene que

La mediana de los valores de ADA1cp en LCR de otras enfermedades es $> =$ las medinas de los valores de ADA1cp en TBC meningea

ANALISIS ESTADISTICO
COMPARACION DE LAS MEDIANAS LOS VALORES DE
ADA2 EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

NIVELES DE ADA2	
OTRAS ENFERMEDADES (X)	TBC MENINGEA (Y)
52,3	25,5
7,2	72,5
59,7	40,3
22,3	10
37,5	59,1
39,1	66,6
0	66,9
4,3	25,7
13,3	17,8
42,6	

HIPOTESIS

- Ho La mediana de los valores de ADA2 en LCR
en otras enfermedades $> \text{ó} =$ la mediana de los valores de
ADA2 en Tuberculosis meníngea.
- Ha La mediana de los valores de ADA2 en LCR
de otras enfermedades del SN es $<$ las medianas de los
valores de ADA2 enTBC meníngea

TABLA DE DATOS Y RANGOS ORIGINALES

x	rango	y	rango
0	1		
4,3	2		
7,2	3		
		10	4
13,3	5		
		17,8	6
22,3	7		
		25,5	8
		25,7	9
37,5	10		
39,1	11		
		40,3	12
42,6	13		
52,3	14		
		59,1	15
59,7	16		
		66,6	17
		66,9	18
		72,5	19

TOTAL = 82

La estadística de Prueba es la Prueba U de MannWhitney

$$T = S + \frac{n(n+1)}{2}$$

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente se obtiene

Un valor de $T = 27$

Cuando se observa en la tabla con $n = 10$ (número de valores x)

$m = 9$ (número de valores y) se tiene un valor de $W_a = 29$

DECISION

Como T es $< W_x$ Se rechaza la hipótesis nula

CONCLUSION

Como se rechaza la hipótesis nula se tiene que

La mediana de los valores de ADA2 en LCR de otras enfermedades es $<$ las medianas de los valores de ADA2 en TBC meníngea

$$0.05 < p < 0.10$$